



# ImmGlo™ Anti-native DNA (nDNA) Antibody Test

*Crithidia luciliae* Substrate



For *in vitro* Diagnostic Use

**REF** Code: 1106 48 Determination

**REF** Code: 1106-2 96 Determination

## PRODUCT INSERT

### INTENDED USE

An indirect immunofluorescence antibody test for the detection and quantitation of antibodies to native (double stranded) deoxyribonucleic acid (nDNA) in human serum.

### SUMMARY AND EXPLANATION

Antibodies to nDNA are specific for systemic lupus erythematosus (SLE) and rarely occur in patients with rheumatoid arthritis, scleroderma or other autoimmune disorders<sup>1</sup>. The frequency and titer of these antibodies fluctuate with disease activity and tend to disappear upon immunosuppressive treatment and during remission. There is a good correlation between the disease activity and anti-nDNA antibody levels<sup>2,7</sup>.

The two most commonly employed methods for detecting anti-nDNA antibodies are radioimmunoassay and immunofluorescence. The specificity and sensitivity of the *Crithidia luciliae* immunofluorescent method are comparable or even better than radioimmunoassay<sup>8-14</sup>. The indirect immunofluorescent test using *Crithidia luciliae* as the antigenic substrate is a simple and specific method for detecting anti-nDNA antibodies. *Crithidia luciliae* contains a kinetoplast, an organelle consisting of compact circular DNA which reacts bright apple-green when the test specimen is positive.

### PRINCIPLES OF PROCEDURE

In the indirect immunofluorescence method used in this kit, patients' sera are incubated on smears of *Crithidia luciliae* to allow binding of antibodies to the substrate. Any antibodies not bound are removed by rinsing. Bound antibodies of the IgG class are detected by incubation of the substrate with fluorescein-labeled, anti-human IgG conjugate. When observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters, positive reactions appear as apple green fluorescence of the kinetoplast with or without associated nuclear staining<sup>15,16</sup>. The titer, which is the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction, is determined by testing serial dilutions<sup>17</sup>.

### PRODUCT INFORMATION

#### Storage and preparation

Store all reagents at 2-8°C. Reagents are ready for use after equilibration to room temperature.

#### Materials provided

**REF** Code: 1106 48 Determination

**REF** Code: 1106-2 96 Determination

6x 

SORB	SLD	8
------	-----	---

 8 well Substrate Slides, *Crithidia luciliae* (1106)

12x 

SORB	SLD	8
------	-----	---

 8 well Substrate Slides, *Crithidia luciliae* (1106-2)

1 x 0.5 ml 

CONTROL	+	nDNA
---------	---	------

 \* nDNA Positive Control. Contains human serum.

1 x 0.5 ml 

CONTROL	-
---------	---

 \* Negative Control. Contains human serum.

1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ FITC</b> *	Anti-human IgG FITC Conjugate. Protect from light.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ FITC EB</b> **†	Anti-human IgG FITC Conjugate containing Evan's Blue. Protect from light.
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	Buffered Diluent.
2 vials	<b>BUF WASH</b>	Phosphate Buffered Saline (PBS). Dissolve each vial to 1 liter.
1 x 5.0 ml	<b>MOUNTING MEDIUM</b> *	Mounting Medium. Do not freeze.
1 x 1.0 ml	<b>EVANS</b>	Evan's Blue Counterstain.
1 x 12	<b>COVER SLD</b>	Coverslips.

\* Contains < 0.1% NaN<sub>3</sub>

† Replaces conjugate without counterstain in Code numbers containing "EB"

### Material required but not provided

Fluorescence microscope  
 Micropipette or Pasteur pipette  
 Serological pipettes  
 Staining dish (e.g. Coplin jar)  
 Small test tubes (e.g. 13 x 75 mm) and test tube rack  
 Distilled or deionized water  
 1 liter container  
 Wash bottle  
 Paper towels  
 Incubation chamber

### WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HbsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regardless of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials<sup>22</sup>.

WARNING - Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from IMMCO. Do not use beyond expiration date.

### SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Only serum specimens should be used for this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of this test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week. For longer storage, serum should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

### PROCEDURE

#### Test Method

#### A. Screening

1. Dilute each patient serum 1:10 with the Buffered Diluent provided (10 µl serum + 90 µl Diluent). Do not dilute Positive or Negative Controls. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.
2. Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for 10-15 minutes. Carefully remove the slides without touching the substrate.

3. Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.
4. Invert dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50  $\mu$ l of the Negative Control to well #1. Similarly apply 1 drop of Positive Control to well #2. Avoid overfilling the wells.
5. Using a micropipette or Pasteur Pipette, apply 1 drop of patient's diluted serum (approximately 50  $\mu$ l) to the other wells. Avoid overfilling the wells.
6. Place the lid on the incubation chamber and incubate slides 30 minutes at room temperature.
7. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately 10 ml PBS using a pipette, or rinse slide in beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash 10 minutes. Repeat process with all remaining slides.
8. Remove slide(s) from Coplin jar. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the Conjugate dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50  $\mu$ l) to each well.
9. Repeat steps **7 and 8** for each slide.
10. Replace the lid on the incubation chamber. Incubate 30 minutes at room temperature.
11. Remove a slide from incubator. Hold the slide at the tab end and dip the slide in a beaker containing PBS to remove excess conjugate. Place slide(s) in a staining dish filled with PBS for 10 minutes. If desired, 2-3 drops of Evans blue counterstain may be added to the final wash. Repeat for the remaining slides. NOTE: Improper washing may lead to increased background fluorescence.
12. Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **To prevent slide from drying, proceed immediately with next step while slide is still wet.**
13. Mount the coverslip by applying **3 drops** of Mounting Medium evenly on the coverslip and place coverslip over slide. Avoid applying undue pressure and prevent lateral movement of the coverslip.
14. Repeat steps 12 and 13 for each slide.
15. Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of 200x or greater.

Slides may be read as soon as prepared. However, because of the presence of antifading agent in the mounting medium, no significant loss of staining intensity occurs if reading is delayed for up to 48 hours. Slides should be stored in the dark at 2-8°C.

## B. Endpoint Determination (titration)

A serum positive in the screening test may be further tested following steps 5 through 13 to determine the titer. Each test run should include the Positive and Negative Controls. Make serial two-fold dilutions starting at 1:10. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

### Preparation of Serial Dilutions

Number six tubes 1 through 6. Add 0.9 ml of Sample Diluent to tube 1 and 0.2 ml to tubes 2 through 6. Pipette 0.1 ml of undiluted serum to tube 1 and mix thoroughly. Transfer 0.2 ml from tube 1 to tube 2 and mix thoroughly. Continue transferring 0.2 ml from one tube to the next after mixing to yield the dilutions depicted in the following table:

Tubes	1	2	3	4	5	6
Serum	0.1 ml					
	+					
Buffered Diluent	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Transfer		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Final dilution	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

### QUALITY CONTROL

Both a Positive and Negative Control should be included with each test run. The Negative

Control should show no specific fluorescence of the kinetoplast. The Positive Control should have 2+ or greater staining intensity of this structure.

If expected results are not obtained, the run should be repeated. If inadequate results continue to occur with the controls, these may be due to:

- Turbidity. Discard and use another control
- Problems with the optical system of the fluorescence microscope. These may include : improper alignment, bulb beyond useful life expectancy, etc.
- Allowing the slide to dry during the procedure.

### **INTERPRETATION OF RESULTS**

The results of the tests for anti-*n*DNA antibodies should be reported as negative (<10), positive, (greater or equal to 320) or alternatively positive with titer.

Read only fields which contain well separated *C. luciliae*. Observe for specific staining of the kinetoplast (see figure 1 at the end of this document). Staining of the nucleus or the polar body should not be interpreted as a positive DNA antibody test. Absence of specific staining of the kinetoplast is considered negative for antibodies to *n*DNA.

### **LIMITATION OF THE PROCEDURE**

In some cases, sera positive for kinetoplast staining may either be very weak or negative at the initial screening dilution prozone phenomenon. In such doubtful cases the sera should be screened at higher dilutions and, if positive, antibody titers determined.

In rare instances false positive reactions may be observed. These may be due to the presence of high levels of lipoproteins or other proteins which bind to DNA<sup>19,20</sup>.

The goat anti-human IgG FITC Conjugate supplied in this kit is primarily heavy chain specific but has some light chain activity. It reacts primarily with IgG class autoantibodies, but may, to a lesser degree, react with light chains of other classes such as IgM.

The clinician should consider the results of all positive indirect immunofluorescence tests along with the results of other laboratory tests and the clinical condition of the patient when making a diagnosis.

### **EXPECTED VALUES**

As seen in table 1 at the end of this document, anti-*n*DNA antibodies are not detected (titer <10) in sera from normal subjects or patients with scleroderma or rheumatoid arthritis. Anti-*n*DNA antibodies occur (titer  $\geq$ 10) in over one half of patients with SLE.

### **PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

The ImmuGlo™ *n*DNA Antibody test was compared with another commercially available fluorescent antibody test using *C. luciliae* as a substrate. The comparison included 106 serum samples from normal subjects as well as from patients with the diagnosis of SLE, scleroderma, or rheumatoid arthritis. Sera were tested according to the procedure and screening dilution recommended by the manufacturer. These yielded comparable results as summarized in table 2.



# ImmuGlo™ ANTICORPS ANTI ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE INDIGÈNE (nDNA)



**REF** Code: 1106 48 Détermination

**REF** Code: 1106-2 96 Détermination

Test par immunofluorescence pour la recherche et le dosage semi-quantitatif des anti-nDNA dans le sérum humain.

## GENERALITES

Les anticorps anti-nDNA sont spécifiques pour l'erythematosus systémique de lupus (SLE) et se produisent rarement dans les patients présentant l'arthrite rhumatoïde, la sclérodermie ou d'autres désordres autoimmuns<sup>1</sup>. La fréquence et le titre de ces anticorps flottent avec l'activité de la maladie et tendent à disparaître sur le traitement immunosuppresseur et pendant la remise. Il y a une bonne corrélation entre l'activité de la maladie et anti les niveaux d'anticorps de nDNA<sup>2-7</sup>.

Les deux méthodes le plus généralement utilisées pour détecter anti des anticorps de DNA sont radioimmunoanalyse et immunofluorescence. La spécificité et la sensibilité de la méthode immunofluorescente de *Crithidia luciliae* sont comparables ou même meilleures que la radioimmunoanalyse<sup>8-14</sup>. L'essai immunofluorescent indirect employant *le Crithidia luciliae* comme substrat antigénique est une méthode simple et spécifique pour détecter anti des anticorps de nDNA. *Le Crithidia luciliae* contient un kinetoplast, une organelle se composant de la DNA compacte de circulaire qui réagit vert comme lumineux quand le spécimen d'essai est positif.

## PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte utilisée dans ce coffret, le sérum du patient est incubé sur des souillures de *crithidia luciliae*, ce qui permet la fixation des autoanticorps avec le substrat. Un lavage de la lame élimine tous les anticorps non fixés. Une incubation du substrat avec un conjugué anti-IgG humaines, marqué à la fluorescéine, permet la détection des anticorps fixés de classe IgG. Les reactivates sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. Une fluorescence vert-pomme du structures spécifique histologique montre la présence du nDNA. Le titre du sérum (la dernière dilution donnant une réaction positive) est alors déterminé par dilutions sériques successives<sup>21</sup>.

## INFORMATION PRODUIT

### Conservation et préparation des réactifs

Conserver tous les réactifs entre 2° et 8° C. Tous les réactifs sont prêts à l'emploi. Avant utilisation, attendre que les réactifs s'équilibrent à la température ambiante du laboratoire.

### Matériel fourni

**REF** Code: 1106 *Crithidia luciliae* 48 déterminations

**REF** Code: 1106-2 *Crithidia luciliae* 96 déterminations

6 x

**Lames 8 puits, *Crithidia luciliae* (1106)**

12 x

**Lames 8 puits, *Crithidia luciliae* (1106-2)**

1 x 0.5 ml

**Contrôle positif nDNA, sérum humain.**

1 x 0.5 ml

**Contrôle négatif, sérum humain.**

1 x 5 ml      **IgG-CONJ FITC\***

**Conjugué FITC anti-IgG** humaines.  
Maintenir à l'abri de la lumière

1 x 5 ml      **IgG-CONJ FITC EB\*\***

**Conjugué FITC anti-IgG** humaines avec de l'Evan's Blue. Maintenir à l'abri de la lumière.

1 x 60 ml      **BUF\***

**Diluant sérum.**

2 fioles      **BUF WASH**

**Tampon phosphate salin (PBS).** Dissoudre chaque flacon pour obtenir 1 litre.

1 x 5.0 ml      **MOUNTING MEDIUM\***

**Milieu de montage.** Ne pas congeler.

1 x 1.0 ml      **EVANS**

**Contre colorant Bleu d'Evans.**

1 x 12      **COVER SLD**

**Lamelles couvre-lames.**

\* Contient < 0.1% NaN<sub>3</sub>

† Remplace le conjugué sans le contre colorant Bleu d'Evans dans des numéros contenant "EB"

### Matériel nécessaire mais non fourni

Microscope à fluorescence  
Micropipette ou pipette Pasteur  
Pipette sérologique  
Bac à coloration pour le lavage des lames  
Petits tubes (ex 13X75 mm) et portoir  
Eau distillée ou déionisée  
Eprouvette graduée 1l  
Flacon pour solution de lavage  
Serviettes en papier  
Chambre d'incubation

### MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

Utilisation comme test de diagnostic in vitro. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et trouvé non réactif en antigène de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti VIH1, anti VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage<sup>22</sup>.

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium. Ce composé peut former avec des canalisations de plomb ou de cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, lors de l'élimination de ces réactifs dans un évier, rincer l'évier à grande eau.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du coffret composants par d'autres provenant d'autres fabricants.

### PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Seuls les sérums peuvent être utilisés dans ce test. Il est recommandé de ne pas les utiliser les sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne pouvant provoquer des interférences avec les performances du test. Conserver les sérums à 2-8°C pendant une semaine au maximum. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

### MODE OPÉRATOIRE

#### A. Dépistage

1. Diluer chaque sérum de patient au 1:10 dans le diluant échantillon fourni (10µl de sérum +

- 90µl de diluant). Ne pas diluer les contrôles positifs ou négatifs. Conserver le sérum pur pour déterminer le titre des autoanticorps dans le cas où le dépistage sera trouvé positif.
2. Laisser revenir les lames à la température du laboratoire pendant 10-15 minutes dans le sachet scellé. Sortir les lames avec précaution sans toucher le substrat.
  3. Numéroté les lames et les placer en chambre humide avec des serviettes papier mouillées pour éviter l'assèchement.
  4. Appuyer doucement sur le flacon pour déposer 1 goutte (environ 50µl) de Contrôle Négatif sur le puits #1. De la même façon déposer 1 goutte de Contrôle Positif sur le puits #2. Eviter de déborder des puits.
  5. Avec une micropipette ou une pipette Pasteur, déposer 1 goutte (environ 50µl) de sérum dilué dans les puits restants. Eviter de déborder les puits.
  6. Recouvrir la chambre humide et incuber les lames 30 minutes à température ambiante.
  7. Sortir une lame de la chambre humide. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette et environ 10 ml de PBS ou rincer la lame dans un bécher rempli de PBS. Ne pas utiliser de pissette. Transférer immédiatement la lame dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Répéter les opérations avec toutes les lames.
  8. Retirer une lame du bac. Eliminer l'excès de PBS sur une serviette papier. Déposer la lame dans la chambre humide. Déposer immédiatement 1 goutte de conjugué dans chaque puits.
  9. Répéter les étapes 7 et 8 avec chaque lame.
  10. Recouvrir la chambre humide et incuber 30 minutes à température ambiante.
  11. Sortir une lame de la chambre humide. Plonger la lame dans un bécher rempli de PBS pour éliminer l'excès de conjugué. Transférer dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Si une contre-coloration est souhaitée, ajouter 2-3 gouttes de Bleu d'Evans dans le dernier bain de lavage. Répéter les opérations avec toutes les lames.
- REM: Un lavage incorrect peut altérer la morphologie des neutrophiles et provoquer un bruit de fond de fluorescence.
12. Retirer une lame du bac. Eliminer l'excès de PBS sur une serviette papier. Pour éviter de mettre à sec les puits, réaliser immédiatement l'étape 13 pendant que la lame est humide.
  13. Déposer doucement 3 gouttes de milieu de montage dans la lamelle couvre-lame également et appliquer la lamelle couvre-lame. Ne pas appliquer de pression excessive et éviter les mouvements latéraux de la lamelle.
  14. Répéter les étapes 12 et 13 avec chaque lame.
  15. Observer la fluorescence spécifique à l'aide d'un microscope au grossissement X200 ou plus.

Les lames peuvent être lues immédiatement. Cependant, grâce à la présence d'un agent anti-fading dans le milieu de montage, la lecture peut être retardée jusqu'à 48 heures sans perte significative de l'intensité de fluorescence. Dans ce cas les lames doivent être conservées à l'obscurité à 2-8°C.

## **B. Détermination du titre par les dilutions en cascade**

Un sérum trouvé positif au test de dépistage doit être retesté en suivant les étapes 5 à 13 afin de définir son titre. Inclure dans chaque nouvelle série un contrôle positif et négatif. Les dilutions en série de 2 en 2 sont réalisées à partir du 1:10. Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive.

## **Préparation des dilutions en série**

Numéroté six tubes de 1 à 6. Ajouter 0.9 ml de diluant échantillon dans le tube 1 et 0.2 ml dans les tubes 2 à 6. Pipetter 0.1 ml de sérum pur dans le tube 1 et agiter soigneusement. Transférer 0.2 ml du tube 1 dans le tube suivant et après agitation répéter la même opération pour les tubes suivants comme indiqué dans le tableau ci-dessous:

Tubes	1	2	3	4	5	6
Sérum	0,1 ml					
	+					
Diluant Echantillon	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Transfert		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Dilution finale	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

### CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série. Le contrôle négatif ne donne pas d'image fluorescente spécifique du kinetoplast. Le contrôle positif on obtient une fluorescence 2+ ou supérieure du kinetoplast.

Dans le cas où les contrôles ne donnent pas les résultats attendus, il est recommandé de refaire le test. Si le problème persiste, cela peut être lié à :

- La turbidité. Éliminer le contrôle et en utiliser un nouveau.
- Au système optique du microscope. Par exemple: mauvais alignement, lampe ayant dépassé sa durée de vie, etc.
- A un assèchement des lames pendant la manipulation.

### INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats des essais pour anti des anticorps de nDNA devraient être rapportés comme négatifs ( $< 10$ ), le positif, (plus grand ou égal à 320) ou alternativement positif avec le titre. Zones de visualisation seulement qui contiennent *Crithidia luciliae* bien séparé. Observer pour la souillure spécifique du kinetoplast (voir le schéma 1 à la fin de ce document). La souillure du noyau ou du corps polaire ne devrait pas être interprétée comme essai positif d'anticorps de nDNA. L'absence de la souillure spécifique du kinetoplast est considérée négative pour des anticorps nDNA.

### LIMITES D'UTILISATION

Dans certains cas, les sérums positifs pour le kinetoplast souillant peuvent être très faibles ou négatif au phénomène initial de prozone de dilution de criblage. Dans de tels cas douteux les sérums devraient être examinés à des dilutions plus élevées et, si positif, à des titres d'anticorps déterminés.

Dans des exemples rares on peut observer des réactions positives fausses. Celles-ci peuvent être dues à la présence des niveaux élevés des lipoprotéines ou d'autres protéines qui lient à DNA<sup>19,20</sup>.

La conjugué FITC anti-IgG humaines fourni dans ce kit est principalement détail à chaînes lourd mais a une certaine activité à chaînes légère. Elle réagit principalement avec des autoanticorps IgG, mais peut, à un peu de degré, réagir avec les chaînes légères d'autres classes telles qu'IgM.

Le clinicien devrait considérer les résultats de tous les essais indirects positifs d'immunofluorescence avec les résultats d'autres essais en laboratoire et de l'état clinique du patient en faisant un diagnostic.

### VALEURS PRÉVUES

Comme vu dans la table ci-dessous, des anticorps de nDNA ne sont pas détectés (titre  $< 10$ ) en sérums d'aucuns sujets ou patients normaux avec présentant la sclérodémie ou l'arthrite rhumatoid. Les anticorps de nDNA se produisent (titre  $\geq 10$ ) dans plus d'une moitié des patients avec SLE.

### PERFORMANCES

L'essai d'anticorps de nDNA a été comparé à un autre essai disponible dans le commerce d'anticorps fluorescent en utilisant le *Crithidia luciliae*. La comparaison a inclus 106 échantillons de sérum provenant des sujets normaux aussi bien que des patients présentant le diagnostic de SLE, de sclérodémie, ou d'arthrite rhumatoid. Des sérums ont été examinés selon la dilution de procédé et de criblage recommandée par le fabricant. Ceux-ci ont donné des résultats comparables comme récapitulés dans la table 2.



# Immulo™ Anti-nativa DNA (nDNA) Anticuerpos



**REF** Code: 1106 48 Determination

**REF** Code: 1106-2 96 Determination

Una prueba inmunofluorescencia indirecta para la detección y la cuantificación de los anticuerpos de nDNA (ácido deoxyribonucleic nativo) en suero humano.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los anticuerpos nDNA son específicos para el Lupus Eritematoso Sistémico (SLE) y ocurren raramente en pacientes con la artritis reumatoide, el escleroderma u otros desórdenes autoinmunes<sup>1</sup>. La frecuencia y el título de estos anticuerpos fluctúan con actividad de la enfermedad y tienden para desaparecer sobre el tratamiento inmunosupresivo y durante la remisión. Hay una buena correlación entre la actividad de la enfermedad y contra los niveles del anticuerpo nDNA<sup>2-7</sup>.

Los dos métodos lo más comúnmente posible empleados para detectar contra los anticuerpos nDNA son radioinmunoanálisis e inmunofluorescencia. La especificidad y la sensibilidad del método inmunofluorescente del *Crithidia luciliae* son comparables o aún mejores que el radioinmunoanálisis<sup>8-14</sup>. La prueba inmunofluorescente indirecta que usa los *Crithidia luciliae* como el sustrato es un método simple y específico para detectar contra los anticuerpos de la nDNA. *Crithidia luciliae* contiene un kinetoplast, un organelle que consiste en la DNA compacta de la circular que reacciona verde brillante cuando el espécimen de la prueba es positivo.

## PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Para la realización del método de inmunofluorescencia indirecta de este equipo tiene que incubarse el suero de los pacientes en sustrato *Crithidia luciliae* y, de este modo, permitir que los anticuerpos puedan unirse al sustrato. Cualquier anticuerpo no unido se elimina mediante lavado del portaobjetos. Los anticuerpos unidos de la clase IgG se detectan mediante incubación del sustrato con un conjugado de IgG antihumano marcado con fluoresceína. Las reacciones se visualizan en un microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados. La presencia de nDNA se demuestra mediante la presencia de fluorescencia de color verde estructuras histológicas específicas. Posteriormente se determina el título (valor recíproco de la mayor dilución que origina una reacción positiva) mediante diluciones seriadas<sup>21</sup>.

## INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

### Almacenamiento y preparación

Almacenar todos los reactivos a una temperatura de 2-8°C. Los reactivos pueden emplearse después de haber sido equilibrados a temperatura ambiente.

### Materiales Suministrados

#### Materials provided

**REF** Code: 1106 *Crithidia luciliae* 48 determinations

**REF** Code: 1106-2 *Crithidia luciliae* 96 determinations

6 x	<b>SORB SLD 8</b>	<b>Portaobjetos de 8 pocillos, <i>Crithidia luciliae</i></b> (1106)
12 x	<b>SORB SLD 8</b>	<b>Portaobjetos de 8 pocillos, <i>Crithidia luciliae</i></b> (1106-2)
1 x 0.5 ml	<b>CONTROL + nDNA *</b>	<b>Control positivo de nDNA</b> , suero humano.
1 x 0.5 ml	<b>CONTROL - *</b>	<b>Control negativo</b> , suero humano.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ FITC *</b>	<b>Conjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC)-IgG anti humana</b> . Proteger de la luz.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ FITC EB **</b>	<b>Conjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC)-IgG anti humana con azul de Evans</b> . Proteger de la luz.
1 x 60 ml	<b>BUF *</b>	<b>Diluyente de la muestra</b> .
2 frascos	<b>BUF WASH</b>	<b>Fosfato salino tamponado (PBS)</b> . Disolver cada vial en 1 litro.
1 x 5.0 ml	<b>MOUNTING MEDIUM *</b>	<b>Medio de preparación</b> . No congelar.
1 x 1.0 ml	<b>EVANS</b>	<b>Colorante de contraste azul de Evans</b> .
1 x 12	<b>COVER SLD</b>	<b>Cubreobjetos</b> .

\* PRECAUCIÓN - Contiene < 0.1% NaN<sub>3</sub>

† Sustituye **Conjugado sin azul de Evans** en los números de código que contienen el "EB"

### Material necesario, pero no suministrado

Microscopio de fluorescencia

Micropipetas o pipeta Pasteur

Pipetas serológicas

Placa de tinción (por ejemplo, frasco de Coplin)

Tubos de ensayo pequeños (por ejemplo, 13 x 75 mm) y gradilla de tubos de ensayo

Agua destilada o desionizada

Envase de 1 litro

Frasco de lavado

Toallas de papel

Cámara de incubación

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico *in vitro*. Todos los componentes de derivados sanguíneos humanos han sido ensayados respecto a la presencia de HbsAg, VHC, VIH-1 y 2 y el virus linfotrofo de células T humanas (VLTH-I), siendo negativos en los ensayos necesarios según la FDA (Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos). Todas las muestras de suero y los derivados sanguíneos humanos deben tratarse como un material potencialmente peligroso, independientemente de su origen. En consecuencia, deben seguirse unas prácticas de laboratorio adecuadas durante el almacenamiento, dispensación y eliminación de dicho material<sup>22</sup>.

**PRECAUCIÓN** - La azida sódica (NaN<sub>3</sub>) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías y formar azidas metálicas muy explosivas. Después y desechar los líquidos, es necesario lavar con un volumen grande de agua para evitar la acumulación de azida. La azida sódica puede ser tóxica si se ingiere. En caso de ingestión, notificarlo inmediatamente al director del laboratorio o al centro toxicológico.

Para poder garantizar la obtención de resultados válidos, deben seguirse de forma exacta las instrucciones indicadas en este prospecto. No intercambiar componentes del equipo por otros diferentes que no tengan el mismo número de catálogo de IMMCO. No utilizar este equipo después de la fecha de caducidad.

## **OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

Para la realización de esta determinación sólo debe utilizarse suero. Las muestras con hemólisis macroscópica, lipémicas o contaminadas por microorganismos pueden interferir en el funcionamiento del ensayo y, por tanto, no deben ser utilizadas. Almacenar las muestras a una temperatura de 2-8°C durante un período no superior a una semana. Cuando se desee un almacenamiento más prolongado, el suero debe congelarse a una temperatura de -20°C. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

## **PROCEDIMIENTO**

### **Método de ensayo**

#### **A. Detección sistemática**

1. Diluir 1:10 el suero de cada paciente con el diluyente de la muestra suministrado (10 µl de suero + 90µl del diluyente). No diluir los Controles Positivo o Negativo. Guardar el suero no diluido para la determinación del título de anticuerpos si los resultados son positivos.
2. Permitir que los pocillos de los portaobjetos que contienen el substrato se equilibren a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraer con cuidado los portaobjetos sin tocar el substrato.
3. Etiquetar los portaobjetos y colocarlos en una cámara de incubación cubierta con toallas de papel humedecidas con agua para evitar la desecación.
4. Invertir el vial cuentagotas y presionar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 µl) del Control Negativo en el pocillo nº 1. De forma similar, aplicar una gota del Control Positivo en el pocillo nº 2. Evitar llenar demasiado los pocillos.
5. Con el empleo de una micropipeta o una pipeta Pasteur, colocar 1 gota del suero diluido del paciente (aproximadamente 50 µl) en los restantes pocillos. Evitar llenar demasiado los pocillos.
6. Tapar la cámara de incubación e incubar los portaobjetos durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Quitar la tapa de la cámara de incubación. Coger el portaobjetos por el extremo y lavar suavemente con 10 ml de PBS mediante el empleo de una pipeta o lavar el portaobjetos en un vaso de precipitado lleno de PBS. No emplear un frasco de lavado. Transferir inmediatamente el portaobjetos al frasco de Coplin y dejarlo durante 10 minutos. Repetir el proceso con todos los portaobjetos restantes.
8. Extraer el portaobjetos del frasco de Coplin. Secar el extremo del portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Colocar el portaobjetos en la cámara de incubación, Invertir inmediatamente el vial cuentagotas del Conjugado y apretar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 µl) en cada pocillo.
9. Repetir las etapas 7 y 8 con cada portaobjetos.
10. Tapar la cámara de incubación. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Extraer el portaobjetos del incubador. Sumergir el portaobjetos en un vaso de precipitado con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Colocar el portaobjetos en una cubeta de tinción llena con PBS durante 10 minutos. Al final del lavado puede añadirse, si se desea, 2-3 gotas de colorante de contraste azul de Evans. Repetir el proceso con los portaobjetos restantes. NOTA: un lavado inadecuado puede repercutir en la morfología de los neutrófilos y puede originar un incremento de la fluorescencia de fondo.
12. Extraer el portaobjetos de la cubeta de tinción. Secar el portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Para evitar que se seque el portaobjetos, realizar inmediatamente, mientras el portaobjetos todavía está húmedo, el proceso descrito en el apartado 13.
13. Añadir 3 gota del Medio de Preparación uniformemente en cubreobjetos y colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos. Evitar la aplicación de una presión excesiva y el movimiento lateral del cubreobjetos.
14. Repetir las etapas 12 y 13 con cada portaobjetos.

15. Examinar el desarrollo de fluorescencia específica en un microscopio de fluorescencia a 200x o más aumentos.

Los portaobjetos pueden leerse al terminar su preparación. Sin embargo, debido a que el medio de preparación contiene un agente antidesgaste, puede retrasarse la lectura durante un período de hasta 48 horas sin que se produzca una pérdida significativa de la intensidad de la tinción. Los portaobjetos deben almacenarse en la oscuridad a una temperatura de 2-8°C.

### B. Determinación del punto de valoración (titulación)

Los sueros positivos durante el ensayo pueden valorarse de forma adicional, etapas 6 - 15, para determinar su titulación. Cada ensayo debe incluir un control positivo y negativo. Realizar diluciones seriadas dobles a partir de 1:10. El título es el valor recíproco de la dilución más elevada que produzca una reacción positiva.

### Preparación de las diluciones seriadas

Numerar 6 tubos del 1 al 6. Añadir 0.9 ml del diluyente de la muestra en el tubo 1 y 0,2 ml en los tubos 2 a 6. Pipetear 0,1 ml del suero no diluido en el tubo 1 y mezclar minuciosamente. Transferir 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezclar meticulosamente. Continuar transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente tras la mezcla y, de este modo, conseguir las diluciones ilustradas en la siguiente tabla:

Tubos	1	2	3	4	5	6
Suero	0.1 ml					
	+					
Diluyente tamponado	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Transferencia		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Dilución final	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

### CONTROL DE CALIDAD

En cada serie de ensayos debe incluirse un control positivo y negativo. El control negativo no debe mostrar fluorescencia específica de los kinetoplasts; por el contrario, el control positivo debe tener una intensidad de tinción igual o superior a 2+ del kinetoplasts. Cuando no se obtienen los resultados esperados, debe repetirse el ensayo. Los resultados anómalos con los controles pueden producirse por:

- Turbidez. Desechar y utilizar otro control.
- Problemas del sistema óptico del microscopio de fluorescencia. Estos problemas pueden incluir un alineamiento inadecuado, una lámpara con fecha posterior a la esperanza de vida útil, etc.
- Secado del portaobjetos durante el procedimiento.

### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de las pruebas para contra los anticuerpos de la nDNA se deben divulgar como negativos (< 10), positivo, (mayor o igual a 320) o alternativamente positivo con título. Solamente leído campos que contienen *C. luciliae* bien separada. Observar para mancharse específico del kinetoplast (véase el cuadro 1 en el extremo de este documento). El mancharse del núcleo o del cuerpo polar no se debe interpretar como prueba positiva del anticuerpo de la DNA. La ausencia de mancharse específico del kinetoplast se considera negativa para los anticuerpos a la nDNA.

### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En algunas cajas, los sueros positivos para el kinetoplast que se mancha pueden ser muy débiles o negativa en el fenómeno inicial del prozone de la dilución de la investigación. En tales casos dudosos los sueros se deben defender en diluciones más altas y, si positivo, títulos del anticuerpo determinados.

En casos raros las reacciones positivas falsas pueden ser observadas. Éstos pueden ser

debido a la presencia de altos niveles de las lipoproteínas o de otras proteínas que atan a la DNA<sup>19,20</sup>.

El conjugado IgG provisto en este kit es sobre todo específico de cadena pesado pero tiene cierta actividad de cadena ligera. Reacciona sobre todo con los autoanticuerpos de la clase IgG, pero puede, a un poco grado, reaccionar con las cadenas ligeras de otras clases tales como IgM.

El clínico debe considerar los resultados de todas las pruebas indirectas positivas de la inmunofluorescencia junto con los resultados de otros pruebas de laboratorio y de la condición clínica del paciente al hacer una diagnosis.

### **VALORES PREVISTOS**

Según lo visto en la tabla 1, contra los anticuerpos nDNA no se detectan (título < 10) en sueros de temas normales o de pacientes con scleroderma o artritis reumatoide. Contra los anticuerpos nDNA ocurren (título  $\geq 10$ ) adentro sobre una mitad de pacientes con SLE.

### **CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL FUNCIONAMIENTO**

La prueba del anticuerpo nDNA fue comparada con otra prueba comercialmente disponible del anticuerpo fluorescente usando el *C.luciliae* como substrato. La comparación incluyó 106 muestras del suero de temas normales así como de pacientes con la diagnosis de SLE, del scleroderma, o de la artritis reumatoide. Los sueros fueron probados según la dilución del procedimiento y de la investigación recomendada por el fabricante. Éstos rindieron resultados comparables según lo resumido en la tabla 2.



# ImmuGlo™ Anti-gebürtige DNA (nDNA) Antikörper-Test

*Crithidia luciliae* Substrat



**REF** Code: 1106 48 Determination

**REF** Code: 1106-2 96 Determination

Ein indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest für die Abfragung und die quantitative Bestimmung der Antikörper zur gebürtigen (Doppeltes angeschwemmt) Desoxyribonukleinsäure (n DNA) im menschlichen Serum.

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Antikörper zu nDNA sind für Systemischem Lupus erythematoses (SLE) spezifisch und treten selten bei Patienten mit Rheumatoiden Arthritis, Sklerodermie oder anderen autoimmunen Störungen auf<sup>1</sup>. Die Frequenz und der Titer dieser Antikörper schwanken mit Krankheittätigkeit und neigen, nach immunsuppressiver Behandlung und während des Erlasses zu verschwinden. Es gibt eine gute Wechselbeziehung zwischen der Krankheittätigkeit und Anti-nDNA Antikörperrniveaus<sup>2-7</sup>.

Die zwei am allgemeinsten eingesetzten Methoden für Anti-nDNA Antikörper ermitteln sind Radioimmunoprobe und Immunofluoreszenz. Die Besonderheit und die Empfindlichkeit der *Crithidia luciliae* immunofluoreszenten Methode sind vergleichbar oder sogar besser als Radioimmunoprobe<sup>8-14</sup>. Der indirekte immunofluoreszente Test, der *Crithidia luciliae* als das Antigensubstrat verwendet, ist eine einfache und spezifische Methode für Anti- nDNA Antikörper ermitteln. *Crithidia luciliae* enthält ein kinetoplast, ein Organell, das aus kompakter Rundschriften DNA besteht, die helles apfelgrünes reagiert, wenn das Testprobestück positiv ist.

## TESTPRINZIP

Bei dem in diesem Test eingesetzten indirekten Immunfluoreszenzverfahren werden Patientenseren mit *Crithidia luciliae* , um die Bindung von in den Seren vorhandenen Autoantikörpern an die Zellen zu ermöglichen. Nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Gebundene Antikörper vom Typ IgG werden durch Inkubation der Zellen mit Fluorescein-markiertem anti-Human-IgG nachgewiesen. Das Reaktionsmuster wird unter einem Fluoreszenzmikroskop bewertet, das mit den entsprechenden Filtern ausgerüstet ist. Das Vorhandensein von nDNA zeigt sich durch eine apfelgrüne spezifische Strukturen Fluoreszenz. Anschließend kann der Titer (der reziproke Wert der höchsten Verdünnung, die eine positive Reaktion zeigt) durch die Untersuchung einer Reihenverdünnung bestimmt werden<sup>21</sup>.

## PRODUKTINFORMATIONEN

### agerung und Handhabung

Alle Reagenzien sind bei 2-8°C zu lagern. Die Reagenzien sind gebrauchsfertig, nachdem sie auf Raumtemperatur gebracht wurden.

### In der Testpackung vorhandenes Material

**REF** Code: 1106 *Crithidia luciliae* 48 determinations

**REF** Code: 1106-2 *Crithidia luciliae* 96 determinations

6 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> 8	Objektträger zu 8 Auftragsstellen, <i>Crithidia luciliae</i> (1106).
12 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> 8	Objektträger zu 8 Auftragsstellen, <i>Crithidia luciliae</i> (1106-2).
1 x 0.5 ml	<b>CONTROL</b> + <b>nDNA</b> *	nDNA Positive Kontrolle, Humanserum.
1 x 0.5 ml	<b>CONTROL</b> - *	Negative Kontrolle, Humanserum.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> *	FITC-Konjugat, Anti-Human-IgG. Lichtgeschützt aufbewahren.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> <b>EB</b> **	FITC-Konjugat, Anti-Human-IgG mit Evans Blau. Lichtgeschützt aufbewahren.
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	Probendiluent.
2 Phiole	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	Phosphatgepuffertes Kochsalz (PBS). Inhalt eines Fläschchens in 1 Liter auflösen.
1 x 5.0 ml	<b>MOUNTING</b> <b>MEDIUM</b> *	Eindeckmittel. Nicht einfrieren.
1 x 1.0 ml	<b>EVANS</b>	Evans Blau Färbemittel.
1 x 12	<b>COVER</b> <b>SLD</b>	Deckgläschen.

\* enthält < 0.1% NaN<sub>3</sub>

† Ersetzt Konjugat ohne Evans Blau Färbemittel in den Kennziffern, die "EB" enthalten.

### Zusätzlich benötigtes Material

Fluoreszenzmikroskop

Mikropipetten oder Pasteurpipetten

Kolbenhubpipette

Färbetrog (z.B. nach Coplin)

Kleine Reagenzröhrchen (z.B. 12x75 mm) und dazu passende Gestelle

Destilliertes oder entionisiertes Wasser

Behälter, 1 Liter

Papierhandtücher

Feuchte Kammer

### WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur für In-vitro-Diagnostik. Alle Bestandteile menschlichen Ursprungs wurden auf das Vorhandensein von HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV-1/HIV-2 und Anti-HTLV-1 mit FDA-zugelassenen Tests untersucht und für negativ befunden. Alle Humanseren und Produkte menschlichen Ursprungs sollten ungeachtet ihrer Herkunft als potentiell gefährlich gehandhabt werden. Diese Materialien und ihre Behältnisse sind nach geltenden Vorschriften und Richtlinien zu lagern und zu beseitigen<sup>22</sup>.

ACHTUNG - Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) kann mit Kupfer und Blei in Leitungen und Lötstellen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren. Um eine Bildung solcher Metallazide zu vermeiden, müssen Ausgüsse nach dem Ausgießen azidhaltiger Lösungen mit reichlich Wasser gespült werden. Natriumazid kann beim Verschlucken giftig sein. Fälle von Verschlucken sofort dem Laborleiter oder der Giftzentrale melden.

Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, ist das Testprotokoll unbedingt einzuhalten. Falls Kitreagenzien ersetzt werden müssen, sollten nur Artikel von IMMCO der gleichen Artikelnummer verwendet werden. Keine verfallenen Reagenzien verwenden.

### PROBENGEWINNUNG UND HANDHABUNG

Bei diesem Verfahren sollte nur Serum verwendet werden. Deutlich hämolytische, lipämische oder mikrobiell kontaminierte Proben können die Leistung dieses Tests beeinträchtigen und sollten daher nicht verwendet werden. Proben sollten nicht länger als eine Woche bei 2-8 °C

gelagert werden. Bei längerer Lagerung sollten sie bei -20°C eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.

## TESTDURCHFÜHRUNG

### Testmethode

#### A. Screening

1. Jedes Patientenserum mit dem Probendiluent aus dem Kit 1:10 (10 µl Serum + 90 µl Diluent) verdünnen. Die positiven und negativen Kontrollen nicht verdünnen. Die unverdünnten Nativseren aufbewahren, um bei positivem Suchtestergebnis gegebenenfalls den Antikörpertiter bestimmen zu können.
2. Beutel mit den beschichteten Objektträgern auf Raumtemperatur bringen (10-15 Minuten). Objektträger vorsichtig entnehmen, ohne die Beschichtung zu berühren.
3. Objektträger beschriften und, um ein Austrocknen der Beschichtung zu verhindern, in eine feuchte Kammer legen.
4. Von den Tropffläschchen mit der Negativen und Positiven Kontrolle jeweils 1 Tropfen (etwa 50 ml) auf die Auftragstellen #1 bzw. #2 ausdrücken. Auftragstellen nicht überfüllen.
5. Mit einer Mikro- oder Pasteurpipette 1 Tropfen verdünntes Patientenserum (etwa 50 µl) auf die weiteren Auftragstellen geben. Auftragstellen nicht überfüllen.
6. Die Objektträger in der abgedeckten feuchten Kammer 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Jeweils einen Objektträger aus der feuchten Kammer nehmen. Am beschrifteten Ende anfassen und sorgfältig mit ca. 10 ml PBS aus einer Pipette spülen; alternativ Objektträger in einem Becher mit PBS spülen. Keine Spritzflasche verwenden. Objektträger sofort in einen Färbetrog mit PBS für 10 Minuten stellen. Mit den anderen Objektträgern ebenso verfahren.
8. Objektträger einzeln aus dem Färbetrog nehmen. Längsseite des Objektträgers gegen ein Papiertuch halten, um Überschuß an PBS zu entfernen. Objektträger in die feuchte Kammer legen und sofort vom Tropffläschchen mit Konjugat 1 Tropfen (ca. 50 µl) auf jede Auftragsstelle ausdrücken.
9. Die Schritte 7 und 8 mit jedem Objektträger einzeln durchführen.
10. Feuchte Kammer abdecken und Objektträger 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
11. Jeweils einen Objektträger aus der feuchten Kammer nehmen. Am beschrifteten Ende anfassen und in einen Becher mit PBS eintauchen, um Überschuß an Konjugat zu entfernen. Objektträger 10 Minuten in einen Färbetrog mit PBS stellen. Falls Gegenfärbung gewünscht ist, können 2-3 Tropfen Evans Blau Färbemittel pro Trog hinzugefügt werden. Mit den anderen Objektträgern ebenso verfahren. HINWEIS: Unsachgemäßes Waschen kann die Morphologie der neutrophilen Zellen beeinträchtigen und eine erhöhte Hintergrundfluoreszenz bewirken.
12. Objektträger einzeln aus dem Färbetrog nehmen. Längsseite des Objektträgers gegen ein Papiertuch halten, um Überschuß an PBS zu entfernen. Um ein Austrocknen der Beschichtung zu vermeiden, sofort mit Schritt 13 fortfahren.
13. 3 Tropfen des Eindeckmittels sorgfältig auf Deckgläschen gleichmäßig geben und ein Deckgläschen auflegen. **Leicht** andrücken und **seitliche** Bewegung des Deckgläschens vermeiden.
14. Die Schritte 12 und 13 mit jedem Objektträger einzeln durchführen.
15. Auf spezifische Fluoreszenz hin unter einem Fluoreszenzmikroskop bei mindestens 200facher Vergrößerung auswerten.

Die Objektträger können sofort nachdem sie angefertigt wurden ausgewertet werden. Weil das Eindeckmittel einen Stoff enthält, der einem Ausbleichen entgegenwirkt, können die Objektträger jedoch bis 48 Std. später ausgewertet werden, ohne daß die Intensität der Fluoreszenz signifikant abklingt. Die Objektträger sollten im Dunkeln bei 2-8°C gelagert werden.

## B. Titerbestimmung

Bei einem im Suchtest positiven Serum kann nach Durchführung der Schritte 5 bis 13 der Titer bestimmt werden. Zu diesem Zweck ist ausgehend von einer 1:10-Verdünnung eine Reihenverdünnung zu erstellen.

Bei jedem Testlauf sollten die positive und negative Kontrolle mitgeführt werden. Der Titer ergibt sich aus dem reziproken Wert der höchsten Verdünnung, die ein positives Ergebnis zeigt.

### Herstellung einer Reihenverdünnung

6 Röhrrchen mit 1 bis 6 beschrifteten. Vom Probendiluent 0,9 ml in Röhrrchen 1 und jeweils 0,2 ml in Röhrrchen 2 bis 6 geben. 0,1 ml unverdünntes Serum in Röhrrchen 1 pipettieren und gründlich durchmischen. Aus Röhrrchen 1 0,2 ml ins Röhrrchen 2 überführen und gründlich durchmischen. Die Verdünnungsreihe wie in der folgenden Tabelle dargestellt fortführen, indem nach Durchmischen jeweils 0,2 ml von einem Röhrrchen in das nächste überführt werden.

Röhrrchen	1	2	3	4	5	6
Serum	0,1 ml					
	+					
Probendiluent	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Zu überführen		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Endverdünnung	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

### QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testlauf sollten sowohl eine positive wie eine negative Kontrolle mitgeführt werden. Die negative Kontrolle sollte keine spezifische Fluoreszenz der Kinetoplast. Die nDNA-positive Kontrolle sollte eine Fluoreszenzintensität von mindestens 2+ der Kinetoplast. Werden die erwarteten Ergebnisse nicht erhalten, sollte der Testlauf wiederholt werden. Sind die Ergebnisse mit den Kontrollen auch dann nicht wie erwartet, kann dies folgende Ursachen haben:

- Trübungen. Kontrolle(n) verwerfen und eine neue verwenden.
- Probleme mit der Optik des Mikroskops, wie z.B.: unsachgemäße Ausrichtung, Lampe zu alt, usw.
- Objektträgerbeschichtung während Testdurchführung ausgetrocknet.

### AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Resultate der Tests für Anti- *n* DNA Antikörper sollten berichtet werden, wie negativ (< 10), Positiv, (grösser oder gleich bis 320) oder wechselweise positives mit Titer. Gelesen worden fängt nur auf, die gut getrenntes *C luciliae* enthalten. Für das spezifische Beflecken des kinetoplast beobachten (siehe Tabelle 1 am Ende dieses Dokumentes). Das Beflecken des Kernes oder des polaren Körpers sollte nicht als positiver DNA Antikörpertest gedeutet werden. Fehlen spezifischem Beflecken des kinetoplast gilt als negativ für Antikörper zu *n* DNA.

### GRENZEN DES VERFAHRENS

In einigen Fällen können die Seren, die für das kinetoplast befleckt positiv sind, entweder sehr schwach oder Negativ am Ausgangssiebungsverdünnung Prozonephänomen sein. In solchen zweifelhaften Fällen sollten die Seren an den höheren Verdünnungen und, wenn Positiv, an den festgestellten worden Antikörpertitern aussortiert werden.

In den seltenen Fällen können falsche positive Reaktionen beobachtet werden. Diese können am Vorhandensein der hohen Niveaus der Lipoproteine oder anderer Proteine liegen, die an DNA binden<sup>19,20</sup>.

Der Konjugat ist hauptsächlich schweres Kettenbesondere aber hat etwas helle Kettentätigkeit. Sie reagiert hauptsächlich mit IgG Kategorie Autoantikörper, aber kann, zu einem wenigen Grad, mit hellen Ketten anderer Kategorien wie IgM reagieren.

Der Kliniker sollte die Resultate aller positiven indirekten Immunfluoreszenztests zusammen mit den Resultaten anderer Laborversuche und des klinischen Zustandes des Patienten betrachten, wenn er eine Diagnose bildet.

#### **ERWARTETE WERTE**

Wie in die Tabelle 1 gesehen, Anti- *n* DNA Antikörper werden (Titer < 10) nicht in den Seren von den normalen Themen oder von den Patienten mit Skerodermie oder Rheumatoiden Arthritis ermittelt. Anti- *n* DNA Antikörper auf (Titer  $\geq$  10) innen über einer Hälfte der Patienten mit SLE.

#### **SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE**

Der ImmuGlo™ *n*DNA Antikörpertest wurde mit einem anderen im Handel erhältlichen Test des Leuchtstoffantikörpers mit *C. luciliae* als Substrat verglichen. Der Vergleich schloß 106 Serumproben von den normalen Themen sowie von Patienten mit der Diagnose von SLE, von Skerodermie oder von Rheumatoiden Arthritis mit ein. Seren wurden entsprechend der Verfahren und Siebungverdünnung geprüft, die durch den Hersteller empfohlen wurde. Diese erbrachten vergleichbare Resultate, wie in dieTabelle 2.



# ImmuGlo™ Anti-DNA nativo (nDNA) Test per la ricerca anticorpale

Substrato *Crithidia luciliae*



**REF** Code: 1106 48 Determinazioni

**REF** Code: 1106-2 96 Determinazioni

Test per la ricerca anticorpale in immunofluorescenza indiretta per la rilevazione e la quantificazione degli anticorpi anti acido desossiribonucleico nativo (nDNA) nel siero umano.

## CARATTERISTICHE GENERALI

Gli anticorpi anti nDNA sono specifici per il lupus eritematoso sistemico (LES) e raramente si presentano in pazienti con l'artrite reumatoide, la dermatosclerosi o altri disordini autoimmuni<sup>1</sup>. La frequenza ed il titolo di questi anticorpi variano con l'attività della malattia e tendono a sparire con il trattamento immunosoppressivo e durante la remissione. C'è una buona correlazione fra l'attività della malattia ed alti livelli di anticorpi nDNA<sup>2-7</sup>.

I due metodi il più comunemente impiegati per la rilevazione degli anticorpi anti nDNA sono l'analisi radioimmunologica e l'immunofluorescenza. La specificità e la sensibilità del metodo in immunofluorescenza del *Crithidia luciliae* sono paragonabili o persino migliori della analisi radioimmunologica<sup>8-14</sup>. Il test in immunofluorescenza indiretta che usa il *Crithidia luciliae* come il substrato antigenico è un metodo semplice e specifico per la rilevazione degli anticorpi anti nDNA. Il *Crithidia luciliae* contiene un chinetoplasto, un organello che consiste in DNA compatto circolare che reagisce verde mela luminoso quando il campione è positivo.

## PRINCIPIO DEL METODO

Nella metodica in immunofluorescenza indiretta utilizzata in questo kit, i sieri dei pazienti vengono incubati su substrato *Crithidia luciliae* per consentire il legame degli anticorpi al substrato. Tutti gli anticorpi non legati vengono eliminati sciacquando il vetrino, mentre gli anticorpi legati del tipo IgG vengono individuati mediante incubazione del substrato con coniugato anti IgG umane, marcato con fluoresceina. Per osservare le reazioni si utilizza un microscopio a fluorescenza dotato di filtri adeguati. Una fluorescenza verde mela del chinetoplasto con o senza colorazione del nucleo conferma la presenza di nDNA. Mediante diluizioni seriali si determina quindi il titolo (il reciproco della diluizione più elevata che causa una reazione positiva).<sup>18</sup>

## CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

### Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a una temperatura di 2-8°C. I reagenti sono pronti per l'uso dopo averli portati a temperatura ambiente.

### Materiali forniti

**REF** Code: 1106 *Crithidia luciliae* 48 determinazione

**REF** Code: 1106-2 *Crithidia luciliae* 96 determinazione

6 x **SORB SLD 8** Vetrini-substrato con 8 pozzetti, *Crithidia luciliae* (1106)

12 x **SORB SLD 8** Vetrini-substrato con 8 pozzetti, *Crithidia luciliae* (1106-2)

1 x 0.5 ml	<b>CONTROL + nDNA</b> *	Controllo positivo nDNA, siero umano.
1 x 0.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	Controllo negativo, siero umano.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ FITC</b> *	Coniugato FITC anti-IgG umane. Tenere lontano dalla luce.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ FITC EB</b> **	Coniugato FITC anti-IgG umane con Blu di Evan. Tenere lontano dalla luce.
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	Diluyente per campioni.
2 flaconcini	<b>BUF WASH</b>	Tampone fosfato-salino (PBS). Ricostituire ciascun flaconcino con 1 litro d'acqua.
1 x 5.0 ml	<b>MOUNTING MEDIUM</b> *	Liquido di montaggio. Non congelare. Ricostituire ciascun flaconcino con 1 litro d'acqua
1 x 1.0 ml	<b>EVANS</b>	Liquido di contrasto. Blu di Evan.
1 x 12	<b>COVER SLD</b>	Vetrini coprioggetto.

\* Contiene < 0.1% NaN<sub>3</sub>

† Sostituisce il coniugato senza Blu di Evans nei numeri di codice che contengono "EB"

### Materiali necessari ma non forniti

Microscopio a fluorescenza  
 Micropipetta o pipetta Pasteur  
 Pipette sierologiche  
 Piastra di colorazione (ad esempio vaschetta di Coplin)  
 Piccole provette (ad es. 13 x 75 mm) e porta provette  
 Acqua distillata o deionizzata  
 Contenitore da 1 litro  
 Bottiglia di lavaggio  
 Carta assorbente  
 Incubatore

### AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*. Il materiale di origine umana utilizzato nella preparazione dei reagenti è stato controllato ed è risultato negativo ai test richiesti dalla FDA per la presenza dell'HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I. Tuttavia, maneggiare tutti i campioni di siero umano e i prodotti di origine umana come fonte potenziale di infezione, indipendentemente dalla loro origine, seguendo le normali pratiche di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e l'eliminazione di questi materiali<sup>22</sup>. ATTENZIONE - Il sodio azide (NaN<sub>3</sub>) può dar luogo a reazioni chimiche pericolose con il piombo ed il rame delle turbature idrauliche. Dopo l'eliminazione dei liquidi, pulire con abbondante acqua per prevenire un accumulo di azide. Il sodio azide è tossico, se ingerito; in questo caso, informare immediatamente il responsabile del laboratorio o un centro per casi di avvelenamento.

Al fine di assicurare risultati validi, si raccomanda di attenersi alle istruzioni riportate in questo inserto. Non scambiare i componenti del kit se non con quelli aventi lo stesso numero di catalogo della IMMCO. Non utilizzare oltre la data di scadenza.

### PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Per questa procedura utilizzare soltanto campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o contaminati possono influenzare i risultati del test e vanno scartati. Conservare i campioni a una temperatura di 2-8°C per non oltre una settimana. Per periodi di conservazione più lunghi, congelare il siero a -20°C, evitando di congelare i campioni più volte.

### PROCEDURA

#### Metodo

#### A. Screening

1. Diluire ciascun siero di paziente 1:10 con il Diluyente per Campioni fornito (10 µl di siero

- + 90 µl di Diluente). **Non diluire i Controlli** Positivi o Negativi. Conservare i sieri non diluiti per determinare i titoli anticorpali se i test di screening risultano positivi.
2. Lasciare che i sacchetti contenenti i vetrini-substrato raggiungano la temperatura ambiente per 10-15 minuti, quindi estrarre i vetrini facendo attenzione a non toccare il substrato.
  3. Marcare i vetrini e porli in una camera umida.
  4. Capovolgere il flaconcino contagocce e versare delicatamente 1 goccia (circa 50 µl) del Controllo Negativo nel pozzetto N. 1. Allo stesso modo versare 1 goccia del Controllo Positivo nel pozzetto N. 2. Evitar di riempire eccessivamente i pozzetti.
  5. Con una micropipetta o con la pipetta Pasteur, versare 1 goccia del siero diluito del paziente (circa 50 µl) negli altri pozzetti, evitando di riempirli eccessivamente.
  6. Mettere il coperchio sulla camera umida ed incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
  7. Togliere un vetrino dalla camera umida. Tenendo il vetrino per l'estremità della linguetta, sciacquarlo delicatamente con circa 10 ml di PBS utilizzando una pipetta o sciacquarlo in un contenitore pieno di PBS. Non utilizzare la bottiglia di lavaggio. Trasferire il vetrino immediatamente nella vaschetta di Coplin e lavare per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
  8. Togliere il/i vetrino/i dalla vaschetta di Coplin. Asciugare il bordo del vetrino su della carta assorbente per togliere la PBS in eccesso. Porre il vetrino nella camera umida. Capovolgere immediatamente il flaconcino contagocce del Coniugato e versarne delicatamente 1 goccia (circa 50 µl) in ciascun pozzetto.
  9. Ripetere i punti 7 e 8 per ciascun vetrino.
  10. Riporre il coperchio sulla camera umida ed incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
  11. Togliere un vetrino dalla camera umida e tenendolo per l'estremità della linguetta, immergerlo in un contenitore pieno di PBS per togliere il coniugato in eccesso. Porre il/i vetrino/i in una piastra di colorazione piena di PBS per 10 minuti. Se si desidera, si possono aggiungere 2-3 gocce di Blu di Evans al lavaggio finale. Ripetere per gli altri vetrini. NOTA: Un lavaggio scorretto può causare una maggiore fluorescenza di fondo.
  12. Togliere un vetrino dalla piastra di colorazione. Asciugare il bordo del vetrino su della carta assorbente per togliere la PBS in eccesso. Per evitare che il vetrino si secchi, passare immediatamente al punto 13 mentre è ancora bagnato.
  13. Montare il vetrino coprioggetto versando delicatamente 3 **gocce** uniformemente di liquido di montaggio su vetrino coprioggetto, quindi porre il coprioggetto sul vetrino. Non applicare eccessiva pressione ed evitare che il coprioggetto si sposti lateralmente.
  14. Ripetere i punti 12 e 13 per ciascun vetrino.
  15. Esaminare la fluorescenza specifica con un microscopio a fluorescenza ad un ingrandimento di almeno 200x. I vetrini si possono leggere appena vengono preparati. Tuttavia, grazie a un agente anti evanescenza presente nel liquido di montaggio, non si verifica alcuna perdita significativa di intensità di colorazione, se la lettura viene posticipata fino a 48 ore. I vetrini devono essere conservati al buio a una temperatura di 2-8°C.

## **B. Titolazione**

Un siero positivo al test di screening può essere ulteriormente analizzato seguendo i punti da 5 a 13 per determinarne il titolo. Ciascuna sessione analitica deve includere i Controlli Positivi e Negativi. Effettuare diluizioni seriali doppie partendo da 1:10. Il reciproco della diluizione più elevata che produce una reazione positiva è il titolo.

## **Preparazione delle Diluizioni Seriali**

Numerare sei provette da 1 a 6. Aggiungere 0,9 ml di Diluente per Campioni alla provetta 1 e 0,2 ml alle provette da 2 a 6. Pipettare 0,1 ml di siero non diluito nella provetta 1 e mescolare accuratamente. Trasferire 0,2 ml dalla provetta 1 alla provetta 2 e mescolare accuratamente. Continuare a trasferire 0,2 ml da una provetta all'altra dopo aver mescolato per ottenere le diluizioni indicate nella tabella seguente:

Provette	1	2	3	4	5	6
Siero	0,1 ml					
	+					
Diluyente tamponato	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Trasferire		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Diluizione finale	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

### CONTROLLO DI QUALITA'

Ciascuna sessione analitica deve comprendere sia un Controllo Positivo che uno Negativo. Il Controllo Negativo non deve mostrare alcuna fluorescenza specifica del chinetoplasto, mentre il Controllo Positivo deve avere un'intensità di colorazione del chinetoplasto 2+.

Se non si ottengono i risultati attesi, bisognerà ripetere l'analisi. Se continuano a verificarsi risultati inadeguati con i controlli, le cause possono essere:

- Torbidità. Scartare e utilizzare un altro controllo.
- Problemi al sistema ottico del microscopio a fluorescenza, quali allineamento non corretto, bulbo scaduto, ecc.
- Essiccamento del vetrino durante la procedura.

### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I campione testati per gli anticorpi anti nDNA dovrebbero essere segnalati come negativi (< 10), positivi, (maggiore o uguale a 320) o in alternativa positivi con il titolo.

Interpretare soltanto campi che contengono la *C. luciliae* ben tinta. Osservare la colorazione specifica del chinetoplasto (vedi figura 1 alla fine di questo documento). Una colorazione del nucleo o del corpo polare non dovrebbe essere interpretata come positività all'anticorpo nDNA. L'assenza di colorazione specifica del chinetoplasto è considerata negativa.

### LIMITI DELLA PROCEDURA

In alcuni casi, i sieri positivi con la colorazione del chinetoplasto possono risultare molto deboli o negativi alla diluizione iniziale di screening a causa dell'effetto prozona. In questi casi dubbiosi i sieri dovrebbero essere analizzati alle diluizioni più alte e, se positivi, dovrebbero essere determinati i titoli anticorpeali determinati.

In casi rari si possono essere osservate reazioni false positive. Queste possono essere dovute alla presenza dei elevati livelli delle lipoproteine o di altre proteine che si legano al DNA <sup>19,20</sup>.

Il clinico dovrebbe considerare i risultati di tutti i test positivi all'immunofluorescenza indiretta con i risultati di altri test di laboratorio e con lo stato clinico del paziente quando fa una diagnosi.

### VALORI ATTESI

Come visto nella tabella 1, alla fine di questo documento, gli anticorpi anti nDNA non sono rilevati (titolo < 10) in sieri di soggetti sani o in pazienti con sclerodermia o l'artrite reumatoide. Gli anticorpi anti nDNA sono presenti (titolo  $\geq$  10) in più della metà dei pazienti con SLE.

### CARATTERISTICHE SPECIFICHE DEL METODO

Il test ImmuGlo™ anti-nDNA è stato comparato con un'altro test di immunofluorescenza disponibile in commercio che utilizza *C. luciliae* come substrato. Il confronto ha incluso 106 campioni di siero provenienti sia da soggetti sani che di pazienti con diagnosi di SLE, sclerodermia, o artrite reumatoide. I sieri sono stati esaminati secondo la procedura e la diluizione di screening raccomandata dal produttore. I risultati ottenuti sono stati paragonati e riassunti nella tabella 2.



# ImmuGlo™ Teste de Anticorpos Anti-nativo DNA (nDNA)

*Crithidia luciliae*

IVD

**REF** Code: 1106 48 Determination

**REF** Code: 1106-2 96 Determination

Teste de anticorpos de imunofluorescência indirecta para a detecção e semi-quantificação de anticorpos ao ácido deoxyribonucleão nativo (nDNA) no soro humano.

## RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os anticorpos ao nDNA são específicos para o Lupus Eritematoso Sistémico (SLE) e ocorrem raramente nos pacientes com artritis reumatoide, ou outras doenças autoimunes<sup>1</sup>. A frequência e o título destes anticorpos flutuam com a atividade da doença e tendem a desaparecer em cima do tratamento imunossupressivo. Há uma correlação boa entre a atividade da doença e os níveis dos anticorpos nDNA<sup>2-7</sup>.

Os dois métodos mais geralmente empregados para detectar anticorpos nDNA são RIA e imunofluorescência. O especificidade e a sensibilidade do método de imunofluorescência de *Crithidia luciliae* são comparáveis ou mesmo melhores do que o RIA<sup>8-14</sup>. O teste de imunofluorescência indirecto que usa o *Crithidia luciliae* como a carcaça é um método simples e específico para detectar anticorpos nDNA. O *Crithidia luciliae* contém um kinetoplast, um organelo que consiste no DNA compacto da circular que reage verde maçã brilhante quando o espécime do teste é positivo.

## PRINCÍPIOS DO MÉTODO

No método de imunofluorescência indirecto usado neste kit, o soro dos pacientes é incubado em *Crithidia luciliae* para permitir a ligação de anticorpos ao substrato. Quaisquer anticorpos livres são removidos através da lavagem da lâmina. Os anticorpos ligados da classe IgG são detectados através da incubação do substrato com conjugado IgG anti-humano fluoresceínico. As reacções são observadas ao microscópio fluorescente equipado com filtros apropriados. A presença de nDNA é demonstrada por uma fluorescência verde maçã estruturas histológicas específicas. A titulação (o recíproco da maior diluição com reacção positiva) é então determinado através da testagem de várias diluições<sup>21</sup>.

## INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO

Armazenamento e preparação

**Guardar todos os reagentes a 2-8°C. Os reagentes estão prontos a usar após ficarem à temperatura ambiente.**

## Material fornecido

**REF** Code: 1106 *Crithidia luciliae* 48 determinations

**REF** Code: 1106-2 *Crithidia luciliae* 96 determinations

6 x 

SORB	SLD	8
------	-----	---

 Lâminas de substrato de 8 poços, *Crithidia luciliae* (1106)

12 x 

SORB	SLD	8
------	-----	---

 Lâminas de substrato de 8 poços, *Crithidia luciliae* (1106-2)

1 x 0.5 ml 

CONTROL	+	nDNA
---------	---	------

 \* Controlo positivo nDNA, soro humano.

1 x 0.5 ml	<b>CONTROL</b>   -	*	Controlo negativo, soro humano.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b>   <b>FITC</b>	*	Conjugado ITCF IgG anti-humano. Proteger da luz.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b>   <b>FITC</b>   <b>EB</b>	**†	Conjugado ITCF IgG anti-humano com Evan's Blue. Proteger da luz.
1 x 60 ml	<b>BUF</b>	*	Diluyente de amostras.
2 frascos	<b>BUF</b>   <b>WASH</b>		Tampão fosfato alcalino (PBS). Dissolver cada frasco num litro.
1 x 5.0 ml	<b>MOUNTING</b>   <b>MEDIUM</b>	*	Meio de suporte. Não congelar.
1 x 1.0 ml	<b>EVANS</b>		Contra corante Azul de Evans.
1 x 12	<b>COVER</b>   <b>SLD</b>		Tampas.

\* Contem < 0.1% NaN<sub>3</sub>

† Os laços do representante Conjugado sem Azul de Evans em jogo números com "EB"

### Material necessário mas não fornecido

Microscópio de fluorescência

Micropipeta ou pipeta Pasteur

Pipetas serológicas

Prato de coloração (ex: Coplin)

Tubos pequenos (ex: 13 x 75 mm) e suportes de tubos

Água destilada ou desionizada

Contentor de 1 litro

Garrafa de lavagem

Toalhetes

Câmara de incubação

### AVISOS E PRECAUÇÕES

Para o diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes derivados dos humanos utilizados foram testados para HbsAg, VHC, HIV-1 e 2 e HTLV-I e deram negativos nos testes FDA. Todos os espécimens de soro humano e produtos derivados dos humanos devem ser tratados como sendo potencialmente perigosos, independentemente da sua origem. Devem-se respistar as boas práticas laboratoriais na armazenagem, distribuição e manuseamento destes materiais<sup>22</sup>. AVISO: A azida sódica (NaN<sub>3</sub>) pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos deve deitar grandes quantidades de água para evitar a formação de tais azidas. A azida sódica pode ser tóxica se ingerida. Se ingerida, contacte imediatamente o director de laboratório ou um centro de envenenamento.

As instruções devem ser seguidas à risca de forma a assegurar resultados válidos. Não trocar componentes dos kits com outros de outras origens. Todos devem ser do mesmo nº da IMMCO. Não utilizar se estiverem fora do prazo.

### RECOLHA DE AMOSTRAS E PREPARAÇÃO

Só os espécimens séricos devem ser utilizados para este teste. Os espécimens hemolizados, lipémicos ou contaminados microbianamente podem interferir com a performance do teste e não devem ser usados. Armazenar a 2-8°C durante apenas uma semana. Para armazenamento mais longo devem ser congelados a -20°C. Evitar repetidas congelações e descongelações.

### MODO OPERATÓRIO

#### Método do teste

##### A. Despistagem

1. Diluir cada soro 1:10 com o Diluyente de amostras fornecido (10 µl soro + 90 µl Diluyente). Não diluir os Controlos Negativo e Positivo. Guardar o soro não diluído para determinar a

titulação de anticorpos, se os testes de despistagem forem positivos.

2. Deixar as bolsas com as lâminas de substrato à temperatura ambiente 10-15 minutos. Retirar as lâminas sem tocar no substrato.
3. Etiquetar as lâminas e colocar na incubadora com toalhetes húmidos para não secarem.
4. Inverter o frasco conta-gotas e apertar para aplicar 1 gota (cerca de 50 µl) de Controlo negativo no poço #1. Coloque 1 gota de Controlo Positivo no poço #2. Não encher demais.
5. Com uma micropipeta ou pipeta Pasteur, colocar 1 gota do soro diluído do paciente (cerca de 50 µl) nos outros poços. Evite encher demais os poços.
6. Colocar a tampa na incubadora e incubar 30 minutos à temperatura ambiente.
7. Retirar a lâmina da incubadora. Segurar pela extremidade e lavar com 10 ml de PBS com uma pipeta, ou lavar com recipiente cheio de PBS. Não usar a garrafa de lavagem. Colocar a lâmina no recipiente Coplin e lavar 10 minutos. Repetir a operação para todas as lâminas.
8. Retirar a lâmina do recipiente Coplin. Limpar as extremidades da lâmina num toalhete para retirar o excesso do PBS. Colocar a lâmina na incubadora. Inverter imediatamente o frasco conta-gotas do Conjugado e deitar 1 gota (cerca de 50 µl) em cada poço.
9. Repetir passos 7 e 8 para cada lâmina.
10. Colocar a tampa da incubadora. Incubar 30 minutos à temperatura ambiente.
11. Retirar uma lâmina da incubadora. Segurar na lâmina e mergulhá-la num recipiente com PBS para remover o excesso de conjugado. Colocar a lâmina num disco de coloração com PBS durante 10 minutos. Pode colocar 2-3 gotas de contracorante azul de Evans à lavagem final. NOTA: Uma lavagem deficiente pode alterar a morfologia dos neutrófilos e levar a um aumento da fluorescência.
12. Retirar a lâmina do prato de coloração. Limpar o excesso de PBS. Para evitar que a lâmina seque deve passar para o ponto 13 enquanto a lâmina ainda está molhada.
13. Colocar a tampa e aplicar 3 gota de Meio de Suporte uniformemente em tampas e colocar a tampa. Não faça muita pressão e evite deslizamento lateral da tampa.
14. Repetir passos 12 e 13
15. Examinar a fluorescência específica com microscópio fluorescente com aumento de 200x ou mais.

As lâminas devem ser lidas quando estão prontas. Contudo, devido à presença de um agente anti-desaparecimento no meio de suporte, não há perdas significativas de intensidade de coloração, se a leitura for adiada até 48 horas. As lâminas devem ser guardadas às escuras a 2-8°C.

## B. Determinação (titulação)

Um soro positivo na despistagem pode ser ainda mais testado com os passos 5 ao 13. Para determinar a titulação. Cada teste deve incluir os Controlos Positivo e Negativo. Fazer duas diluições começando com 1:10. O recíproco da diluição mais elevada a produzir uma reacção positiva é a titulação.

### Preparação de diluições em série

Numerar 6 tubos de 1 a 6. Juntar 0,9 ml de diluente ao tubo 1 e 0,2 ml aos tubos 2 a 6. Pipetar 0,1 ml de soro não diluído para o tubo 1 e mexer bem. Transferir 0,2 ml do tubo 1 para o tubo 2 e mexer bem. Continuar a transferir 0,2 ml de um tubo para o outro após mexer.

Tubos	1	2	3	4	5	6
Soro	0,1 ml					
	+					
Diluente tamponado	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		⇩	⇩	⇩	⇩	⇩
Transferência		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Diluição final	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

## CONTROLO DA QUALIDADE

O Controlo Positivo e o Negativo devem ser incluídos em cada teste. O Controlo Negativo não deve ter fluorescência específica do kinetoplasts, enquanto que o Controlo Positivo deve ter 2+ ou maior intensidade de coloração do kinetoplasts.

Se não se obtiverem os resultados esperados, o teste deve ser repetido. Se resultados inadequados continuarem a ocorrer com os controlos, pode deverse a:

- Turbos. Usar outro controlo.
- Problemas no sistema óptico do microscópio de fluorescência: alinhamento incorrecto, lâmpada a precisar de ser mudada, etc.
- Lâmina seca durante o processo.

## INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados dos testes para anticorpos nDNA devem ser relatados como negativos (< 10), o positivo, (mais grande ou igual a 320) ou o alternativamente positivo com titulação. Somente lido campos que contêm *C. luciliae* bem separado. Observar para manchar específico do kinetoplast (ver figura 1 na extremidade deste original). Manchar do núcleo ou do corpo polar não deve ser interpretado como um teste positivo do anticorpos do DNA. A ausência de manchar específico do kinetoplast é considerada negativa para anticorpos nDNA.

## LIMITAÇÕES DO MODO OPERATÓRIO

Em algumas caixas, os soro positivos para o kinetoplast que mancha podem ser muito fracos ou negativo no fenómeno inicial do prozone da diluição da seleção. Em tais casos duvidosos os soro devem ser selecionados em umas diluições mais elevadas e, se positivo, em titulação do anticorpos determinados.

Em exemplos raros as reações positivas falsas podem ser observadas. Estes podem ser devido à presença de níveis elevados dos lipoproteins ou das outras proteínas que ligam a DNA<sup>19,20</sup>.

O clínico deve considerar os resultados de todos os testes indiretos positivos do imunofluorescência junto com os resultados de outros testes de laboratório e da condição clínica do paciente ao fazer um diagnóstico.

## VALORES ESPERADOS

Como visto na tabela 1, os anticorpos nDNA não são detectados (titulação < 10) nos soro dos assuntos ou dos pacientes normais com scleroderma ou artritis reumatoide. Os Anti-nDNA anticorpos ocorrem (titulação  $\geq$  10) dentro sobre uma metade dos pacientes com SLE.

## CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE ESPECÍFICA

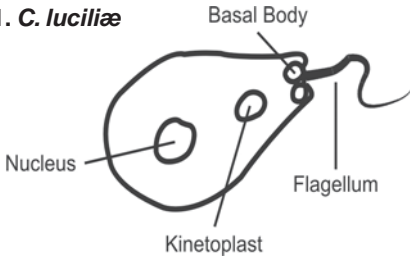
O teste ImmuGlo™ anti-nDNA anticorpos foi comparado com um outro teste comercialmente disponível do anticorpos fluorescente usando o *C. luciliae* como uma carga. A comparação incluiu 106 amostras do soro dos assuntos normais ou de pacientes com o diagnóstico de SLE, de scleroderma, ou do artritis reumatoide. Os soro foram testados de acordo com a diluição do procedimento e da seleção recomendada pelo fabricante. Estes renderam resultados comparáveis como sumariados na tabela 2.

## REFERENCES•REFERENCIAS•LITERATUR•RIFERIMENTI

1. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 33: 167-240, 1982.
2. Kumar V, Beutner EH and Chorzelski TP. Autoimmunity of the skin. In "Concepts in Immunopathology", Vol 1, Cruse JM and Lewis RE Jr, Eds, Karger, Basel, 318-353, 1985.
3. Reimer G, Cornell RC and Tan EM. The biochemical nature of nuclear antigens reactive with antinuclear antibodies. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 519-531, 1987.
4. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Standardization of antinuclear antibody and other immunofluorescent tests used in immunopathologic studies of the skin. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 41-64, 1987.
5. Tan EM, Chan EKL, Sullivan KF and Rubin RL. Antinuclear antibodies (ANAs): Diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 47: 121-141, 1988.
6. Manns M, Gerken G, Kyriatsoulis A and Meyer zum Büschenfelde KH. Significant autoimmune markers of autoimmune liver disorders: Current status. *J Clin Lab Anal* 1: 362-370, 1987.
7. Mackay IR. Autoimmunity and the liver. *Clin Aspects Immunity* 2: 8-17, 1988.
8. McMillan SA, Alderdice JM, McKee CM et al. Diversity of autoantibodies in patients with anti-mitochondrial antibody and their

- diagnostic value. J Clin Path 4: 232-236, 1987.
9. Gershwin ME, Coppel RL and Mackay IR. Primary biliary cirrhosis and mitochondrial autoantigens - insights from molecular biology. Hepatology 8: 147-151, 1988.
  10. Berg PA and Klein R. Mitochondrial antigens and autoantibodies from anti-M1 to anti-M9. Klin Wochenschr 64: 897-909, 1986.
  11. Popper H and Paronetto F. Clinical, histologic and immunopathologic features of primary biliary cirrhosis. Springer Semin Immunopathol 3: 339-354, 1980.
  12. Berg PA and Bacon H. Serology of primary biliary cirrhosis. Springer Semin Immunopathol 3: 355-373, 1980.
  13. Anderson P, Small JV and Sobieszek A. Studies on the specificity of smooth muscle antibodies. Clin Exp Immunol 22: 22-29, 1975.
  14. Kurki P, Miettinen A, Linder E, Pikkarainen P, Vuoristo M and Salaspuro MP. Different types of smooth muscle antibodies in chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis: Their diagnostic and prognostic significance. Gut 21: 878-884, 1980.
  15. Fisher JB and Taylor KB. The significance of gastric antibodies. Brit J Haematol 20: 1-7, 1971.
  16. Chisholm M. Immunology of gastritis. Clin Gastroenterol 5: 419-428, 1976.
  17. Bigazzi PE, Burek CL and Rose NR. Antibodies to tissue-specific endocrine, gastrointestinal and neurological antigens. In "Manual of Clinical Laboratory Immunology". Rose NR, Friedman H and Fahey JL, Eds, American Society for Microbiology, Washington DC, 762-770, 1986.
  18. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 3-40, 1987.
  19. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, 1993 [HHS Pub. No. (CDC) 93-8395].
  20. Nisengard R.J. Antinuclear antibodies: Significance of titers. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Bean S, Eds, John Wiley and Sons, New York, 2nd Ed, 387-398, 1979.
  21. Meyer zum Büschenfelde KH, Manns M and Trautman F. Autoimmunity in chronic liver diseases - relationship to SLE? In "Recent Advances in Systemic Lupus Erythematosus". Lambert PH, Perrin L, and Izui S, Academic Press, New York, 259-269, 1984.
  22. Walker JG, Doniach D, Roitt IM and Sherlock S. Serologic tests in the diagnosis of primary biliary cirrhosis. Lancet 1: 827, 1965.
  23. Paronetto F and Popper H. Hetero-iso- and autoimmune phenomena in the liver. In "Textbook of Immunopathology", Miescher PA and Müller-Eberhard HJ, Eds, Grune and Stratton, New York, 2nd Ed, 789-817, 1976.

**Figure 1. *C. luciliae***



**Table 1.** Incidence of Antibodies to *n*DNA in Collagen-Vascular Disorders as detected by Indirect Immunofluorescence on *C. luciliae*

Clinical Condition	No. Tested	No. Positive	% Positive
SLE	28	19	68
Scleroderma	23	0	0
Rheumatoid Arthritis	8	0	0
Normal Controls	106	0	0

**Table 2.** Comparison of Kits using *C. luciliae* Substrate for the Detection of Antibodies to *n*DNA

Clinical Condition	n	IMMCO		Other	
		Positive	% Positive	Positive	% Positive
SLE	28	19	68	13	46
Scleroderma	23	0	0	0	0
Rheumatoid Arthritis	8	0	0	0	0
Normal Controls	106	0	0	0	0

*For technical assistance please contact:*



**IMMCO Diagnostics, Inc.**

**60 Pineview Drive**

**Buffalo, NY 14228-2120**

**Telephone: (716) 691-0091**

**Fax: (716) 691-0466**

**Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST**

**E-Mail: [info@immcodiagnostics.com](mailto:info@immcodiagnostics.com)**

*or your local product distributor*



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante  
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,

The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299

[www.emergogroup.com](http://www.emergogroup.com)